

Dipeptidyl peptidase II from porcine seminal plasma : purification, characterization, and its homology to granzymes, cytotoxic cell proteinases (CCP 1-4)

著者	黄 凱
発行年	1998-03-24
その他の言語のタイトル	ブタ精漿のdipeptidyl peptidase II : 精製、諸性質およびグランザイム、細胞傷害性細胞プロテイナーゼ (CCP1-4) との相同性 ブタ セイショウ ノ dipeptidyl peptidase II : セイセイ ショセイシツ オヨビ グランザイム サイボウ ショウガイセイ サイボウ プロテイナーゼ CCP 1-4 トノ ソウドウセイ
URL	http://hdl.handle.net/10422/2490

氏名・(本籍)	黄 凱 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第285号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	Dipeptidyl peptidase II from porcine seminal plasma : purification, characterization, and its homology to granzymes, cytotoxic cell proteinases (CCP 1-4) (ブタ精漿のdipeptidyl peptidase II : 精製、諸性質およびグランザイム、細胞傷害性細胞プロテイナーゼ (CCP 1-4) との相同性)
審査委員	主査 教授 岡田 裕 作 副査 教授 可児 一 孝 副査 教授 大久保 岩 男

論文内容の要旨

【目 的】

Dipeptidyl peptidase II (DPP II) はタンパク質やペプチドのN末端に存在するLys-AlaやGly-Proなどの2残基のアミノ酸を特異的に遊離するプロテアーゼである。この酵素は哺乳類の腎臓、脳、筋肉などの臓器や腹腔内マクロファージ、さらに脳脊髄液や精漿に広く分布する。精巣上体の上皮細胞に存在するDPP IIは成熟途中の精子に由来する吸収ポリペプチドの分解に重要な役割を果たしていると推定されているが、精漿中のDPP IIについてはほとんど解析されていない。本研究では、ブタの精漿からDPP IIを精製し、その物理化学的諸性質を解析し、さらにそのN末端アミノ酸配列の決定を試みた。

【方法および結果】

酵素活性の測定には、基質としてLys-Ala-MCAを用い、遊離してきたAMCをEx 380nm、Em 440nmで測定して本酵素活性とした。試料としてブタ精漿(約1 L)を用いた。本酵素の精製は、DEAE-Sephacel、Sephacryl S-300HR、Matrex Gel Red A、Zn-Chelate Cellulofine、Phenyl-Superoseなどのカラムクロマトグラフィを用い行い、最終的に精製倍率1700倍、比活性0.8 μ mole/mg/minの標品を得た。この精製酵素はSDS-PAGE上単一バンドであり、その分子量は58,000 (—SH) および61,000 (+SH) であった。PAGEとゲル濾過法で本酵素は185,000および200,000の分子量を示した。また、この酵素はpH6.0に最適pHを有し、55℃、30分の加熱に、またpH3.5から10.0の広い範囲のpHに24時間、安定であった。Diprotin Aやbenzamidine、E-64、EDTA、 β -MEなどはその活性に影響を与えなかったが、DFP、AEBSF、 Cu^{2+} などで強い活性阻害効果が認められた。さらに、本酵素のN末端のアミノ酸配列を41残基決定した。

【考察および結論】

本研究で、初めてブタ精漿からDPP IIが精製された。精製されたDPP IIはSDS-PAGEとPAGE、ゲル濾過法での結果から三量体であると推定された。DFPおよびAEBSFが本酵素の活性を強く阻害したことからDPP IIはserine proteaseであると考えられた。 Cu^{2+} によって活性阻害がかかることから、DPP IIの分子上に金属結合部位があり、本酵素の活性制御に重要な役割を果たしていると推定された。また初めて決定されたDPP IIのN末端のアミノ酸配列は四種類のCCPのN末端アミノ酸配列と11.6—30.2%の相同性を示した。

論文審査の結果の要旨

Dipeptidyl peptidase II (DPP II) は生理活性ペプチドやタンパク質のN末端に存在するLys-

AlaやGly-Proなどの2残基のアミノ酸を特異的に遊離するプロテアーゼである。本研究は、ブタの精漿からDPPⅡを精製し、アミノ酸配列を含む物理化学的諸性質を明らかにしようとしたものであり、以下の結果が得られている。

- 1] 本酵素は、Zn-Chelate Cellulofine, Phenyl-Superoseなどのカラムクロマトグラフィで、SDS-PAGE上単一バンドまで精製された。その分子量は58,000 (−SH) および61,000 (+SH) であった。この結果とPAGEやゲル濾過法での分子量から自然条件下での本酵素は三量体であった。
- 2] DFP, AEBSFなどに対する挙動から、本酵素はserine proteaseの一つであった。
- 3] 本酵素のN末端のアミノ酸配列を41残基決定したところ、granzymeやPro-X carboxypeptidaseと相同性が高いことが判明した。
- 4] 免疫組織化学的染色から、本酵素は精巣、精巣上体などの生殖器や腎臓、肝臓、脳などに広く存在した。

以上の研究は、精漿中のDPPⅡを精製し、その物理化学的諸性質や組織局在などを初めて明らかにした点において生化学分野に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。